

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
6 novembre 2003 (06.11.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/091383 A2

- (51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N (74) Mandataires : VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.; CABINET ORES, 36, rue de St Pétersbourg, F-75008 PARIS (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale : PCT/FR03/01280 (81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SI, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Date de dépôt international : 23 avril 2003 (23.04.2003)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité : 02/05048 23 avril 2002 (23.04.2002) FR (84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 PARIS (FR). INSTITUT GUSTAVE ROUSSY [FR/FR]; 39, rue Camille Desmoulins, F-94800 VILLEJUIF (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : KOS-MATOPOULOS, Kostas [GR/FR]; 70, rue du Javelot, F-75013 PARIS (FR). ALVES, Pedro [PT/FR]; 10, sentier des Voisinoux, F-92190 MEUDON (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.



WO 03/091383 A2

(54) Title: EPHA2 ANTIGEN T EPITOPES

(54) Titre : EPITOPES T DE L'ANTIGENE EPHA2.

(57) Abstract: The invention concerns peptides constituting T epitopes of EphA antigen, exhibited by MHC I. Said peptides are useful in particular in antitumoral immunotherapy.

(57) Abrégé : L'invention est relative à des peptides constituant des épitopes T de l'antigène EphA2, présentés par le CMH I. Ces peptides sont utilisables notamment en immunothérapie anti-tumorale.

ATTORNEY DOCKET NUMBER: 10271-058-999  
SERIAL NUMBER: 10/823,259  
REFERENCE: B04

BEST AVAILABLE COPY

**EPITOPES T DE L'ANTIGENE EPHA2**

La présente invention est relative à des peptides dérivés de la protéine EphA2 et à leur utilisation en immunothérapie antitumorale.

5 La vaccination ou immunothérapie peptidique est une approche thérapeutique qui fait actuellement l'objet d'un grand intérêt dans le cadre de la prévention ou du traitement des cancers. Son principe repose sur l'immunisation par des peptides reproduisant des épitopes  
10 T d'antigènes tumoraux reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL), qui jouent un rôle majeur dans l'élimination des cellules cancéreuses exprimant ces antigènes à leur surface.

On rappellera que les CTL ne reconnaissent pas  
15 les antigènes protéiques entiers, mais des fragments peptidiques de ceux-ci, présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exprimées à la surface de différentes cellules. Ce sont ces fragments peptidiques qui constituent les épitopes T.

20 La présentation de ces peptides résulte d'un processus complexe, dénommé « apprêtement de l'antigène », qui implique 3 étapes principales :

- la dégradation cytosolique des antigènes par un complexe multienzymatique dénommé protéasome ;
- 25 - la translocation des peptides issus de cette dégradation dans le réticulum endoplasmique (RE) par les transporteurs TAP ;
- l'association de ces peptides avec le CMH pour former des complexes stables peptide/CMH, qui seront  
30 exportés à la surface cellulaire.

La présentation des épitopes T à la surface cellulaire dépend notamment de la stabilité de la protéine antigénique dans le cytosol, des sites et de la fréquence des coupures effectuées par le protéasome, de  
35 l'efficacité de la translocation dans le RE par les transporteurs TAP, et de la capacité des peptides à se

fixer aux molécules du CMH et à former des complexes peptide/CMH stables.

Les épitopes présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) ont généralement  
5 8 à 11 acides aminés, et sont reconnus par les cellules T CD8+, qui représentent la composante majeure de la réponse cytotoxique. Les épitopes présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) ont généralement 13 à 18 acides aminés et sont  
10 reconnus par les cellules T CD4+.

L'identification de ces épitopes, et notamment (compte tenu du rôle essentiel de la réponse CD8+ dans la cytotoxicité) de ceux présentés par le CMH I, constitue donc une étape essentielle pour le développement de  
15 compositions d'immunothérapie anti-tumorale.

De nombreux antigènes tumoraux capables d'induire une réponse CTL sont connus à l'heure actuelle. Certains des épitopes T de ces antigènes ont été identifiés, et l'efficacité de vaccins à base de peptides  
20 reproduisant ces épitopes T a été montrée dans de nombreux cas. Cependant, l'expression de la majorité de ces antigènes est restreinte à certains types histologiques de tumeurs, ce qui limite leur utilisation clinique. Il est donc souhaitable d'identifier d'autres  
25 antigènes tumoraux exprimés par un grand nombre de tumeurs d'origine variée, et qui soient en outre capables d'induire une réponse immunitaire cytotoxique antitumorale.

Le récepteur EphA2, précédemment dénommé ECK  
30 (LINDBERG et HUNTER, Molec. Cell. Biol. 10, 6316-6324, 1990), est un récepteur membranaire, possédant une activité tyrosine kinase. La séquence du récepteur EphA2 humain est représentée dans la figure 1 (SEQ ID NO : 1). Ce récepteur comprend un domaine extracellulaire de 534  
35 acides aminés, un domaine transmembranaire de 24 acides aminés, et un domaine cytoplasmique de 418 acides aminés

qui contient le domaine tyrosine kinase. Ce récepteur est surexprimé dans plusieurs types de cancer tels que le cancer du colon, du sein, de la prostate, du poumon, de l'estomac, de l'œsophage ainsi que le mélanome métastatique, mais n'est pas surexprimé dans des lésions non cancéreuses de ces mêmes tissus (ROSENBERG et al. Am. J. Physiol. 273, 824, 1997; ZELINSKI et al. Cancer Res. 61, 2301, 2001; NEMOTO et al. Pathobiology 65, 195, 1997, EASTY et al. Int. J. Cancer 60, 129, 1995; WALKER DANIEL et al. Prostate 41, 275, 1999). Il a été observé que la surexpression d'EphA2 était liée à la transformation maligne et facilitait la progression métastatique des tumeurs. De plus, EphA2 joue un rôle important dans la néovascularisation tumorale (OGAWA et al. Oncogene 19, 6043, 2000).

Du fait de sa surexpression dans de nombreux types de tumeurs, et de son implication dans la transformation maligne et dans l'angiogenèse tumorale, il a été proposé d'utiliser EphA2 comme cible de traitements antitumoraux. Ainsi, la Demande PCT WO 01/121172 propose l'utilisation d'anticorps dirigés contre des épitopes B portés par le domaine extracellulaire du récepteur EphA2 pour l'immunothérapie antitumorale passive.

Cependant, on ignorait jusqu'à présent si EphA2 pouvait être apprêté efficacement pour générer des épitopes T capables d'induire une réponse cytotoxique antitumorale. *A fortiori*, aucun épitope T de cet antigène n'avait été identifié.

Les Inventeurs ont maintenant identifié dans EphA2 des peptides immunogènes présentés par le CMH I, et induisant des lymphocytes T cytotoxiques capables de lyser des cellules tumorales exprimant EphA2.

La présente invention a en conséquence pour objet un peptide immunogène constituant un épitope T présenté par le CMH I, caractérisé en ce qu'il est

constitué par un fragment de 8 à 11 acides aminés consécutifs de l'antigène EphA2.

Dans le cadre de l'exposé de la présente invention, on entend par « peptide immunogène » un peptide capable d'induire une réponse CTL spécifique contre l'antigène EphA2.

Des peptides conformes à l'invention peuvent être obtenus de diverses manières à partir de l'antigène EphA2. Par exemple il est connu que des peptides susceptibles de former un complexe avec un allèle du CMH I donné ont en commun la présence, à certaines positions, de résidus d'acides aminés particuliers, dénommés « résidus d'ancrage ». On a ainsi défini pour les différents allèles du CMH I, des motifs d'ancrage spécifiques, impliquant des acides aminés dénommés « résidus d'ancrage primaires ». Il a aussi été montré que des résidus situés en dehors des motifs d'ancrage primaires (résidus d'ancrage secondaires) pouvaient exercer un effet favorable ou défavorable sur l'affinité du peptide pour le CMH.

Le choix des séquences peptidiques susceptibles de constituer des épitopes présentés par un allèle du CMH I donné, peut s'effectuer, de manière classique, par l'analyse de la séquence peptidique de l'antigène EphA2, afin de sélectionner les peptides possédant tout ou partie du motif d'ancrage primaire correspondant à cet allèle. Différentes bases de données répertoriant les motifs d'ancrage connus sont disponibles : à titre d'exemples, on citera la base SYFPEITHI (<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi/>; RAMMENSEE et al., Immunogenetics, 50, 213-219, 1999), ou la base BIMAS ([http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla\\_bind](http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind) ; PARKER et al., J. Immunol. 152, 163, 1994).

Généralement, on déterminera ensuite l'affinité de liaison des peptides ainsi identifiés pour

l'allèle du concernée, ainsi que la stabilité du complexe peptide/molécule du CMH I. En effet, les peptides non-immunogènes présentent le plus souvent une faible affinité pour les molécules du CMH I, et/ou forment avec  
5 celles-ci un complexe peu stable. Des méthodes pour déterminer l'affinité du peptide pour la molécule du CMH I, et la stabilité du complexe formé sont connues en elles-mêmes. On citera par exemple celle décrite par FIRAT *et al.* (Eur. J. Immunol., 29, 3112, 1999).

10 L'affinité d'un peptide pour une molécule du CMH I est le plus souvent définie par rapport à celle d'un peptide de référence (par exemple IVGAETFYV (SEQ ID NO :2) pour HLA-A\*0201 ou RPHERNGFTV (SEQ ID NO :3) pour HLA-B\*0702), sous forme d'affinité relative. L'affinité  
15 relative est définie comme le rapport entre la concentration du peptide testé et la concentration du peptide de référence permettant la formation dans les mêmes conditions, de la même quantité de complexe peptide/molécule du CMH I. Plus l'affinité relative est  
20 importante, plus l'affinité de liaison du peptide pour la molécule du CMH I sera faible.

La stabilité du complexe peptide/molécule du CMH I est souvent définie par la DC50, qui représente le temps nécessaire à la dissociation de 50% des complexes  
25 formés.

Par exemple, dans le cas des peptides potentiellement immunogènes et présentés par HLA-A\*0201, l'affinité relative est généralement inférieure à 5 et la DC<sub>50</sub> supérieure à 2 heures.

30 L'immunogénicité des peptides potentiellement immunogènes ainsi détectés peut être vérifiée, par exemple par des méthodes classiques de détermination de la capacité de ce peptide à générer, *in vivo*, *ex vivo*, ou *in vitro* une réponse CTL spécifique vis-à-vis de  
35 cellules-cibles chargées avec ce peptide, ou exprimant l'antigène EphA2 dont il est issu.

Les peptides possédant une faible affinité pour la molécule du CMH I concernée, et/ou formant avec cette dernière un complexe peu stable, ont généralement une faible immunogénicité. Toutefois, ces peptides  
5 peuvent présenter un intérêt thérapeutique, dans la mesure où il apparaît que les épitopes de faible affinité ne participent que peu ou pas à l'établissement de phénomènes de tolérance, qui constituent un des principaux écueils de la vaccination antitumorale.

10 Dans ce cas, il est possible de préparer des peptides variants dont l'immunogénicité est plus importante, par substitution d'un ou plusieurs des acides aminés du peptide natif par un ou plusieurs acides aminés favorables à l'affinité pour la molécule du CMH I  
15 concernée et/ou à la stabilité du complexe peptide/molécule du CMH I.

Ces peptides variants font également partie de l'objet de la présente invention.

Des acides aminés favorables à l'affinité pour  
20 une molécule du CMH I donnée et/ou à la stabilité du complexe peptide/molécule du CMH I, peuvent par exemple être constitués par des résidus d'ancrage, et notamment les résidus d'ancrage secondaires, connus pour la molécule du CMH I concernée. Ces résidus d'ancrage  
25 peuvent facilement être identifiés par consultation des bases de données disponibles, comme celles mentionnées ci-dessus.

A titre d'exemple de substitution permettant d'augmenter l'immunogénicité d'un peptide présenté par  
30 une molécule du CMH I, et notamment par HLA-A\*0201, on citera la substitution de l'acide aminé N-terminal dudit peptide par une tyrosine, comme décrit dans la Demande PCT WO 02/08716.

L'affinité d'un peptide variant pour la  
35 molécule du CMH I concernée, ainsi que son immunogénicité

peuvent ensuite être vérifiées comme indiqué ci-dessus pour les peptides natifs.

A titre d'exemple non limitatif de réalisation de la présente invention, les Inventeurs ont identifié  
5 cinq peptides, dénommés ci-après p58, p61, p546, p550 et p883, présentés par HLA-A\*0201.

Les séquences (code 1 lettre) de ces peptides sont les suivantes :

10 p58 : IMNDMPIYM (SEQ ID NO: 4);  
p61 : DMPIYMYSV (SEQ ID NO: 5);  
p546 : VLLLVLGV (SEQ ID NO: 6);  
p550 : VLAGVGFFI (SEQ ID NO: 7);  
p883 : TLADFDPV (SEQ ID NO: 8).

Ils ont également obtenu, à partir du peptide  
15 p61, qui ne présente qu'une faible affinité pour HLA-A\*0201, et une faible immunogénicité, un peptide immunogène, dénommé ci-après p61Y de séquence YMPIYMYSV (SEQ ID NO: 9), résultant de la substitution du résidu N-terminal de p61 par un résidu tyrosine.

20 Ces peptides sont capables d'induire une réponse CTL spécifique vis-à-vis de cellules HLA-A\*0201 exprimant EphA2. Ils induisent notamment une réponse cytotoxique vis-à-vis de cellules tumorales HLA-A\*0201 issues de tumeurs de types variés.

25 La présente invention a également pour objet des compositions comprenant au moins un peptide immunogène conforme à l'invention, ou une molécule d'acide nucléique codant pour ledit peptide.

Il peut s'agir de compositions  
30 multiépitopiques, capables de générer une réponse CTL polyspécifique, et qui dans ce but comprennent également un ou plusieurs autre(s) épitope(s) immunogène(s). Ces autres épitopes peuvent être issus d'EphA2, ou d'un ou plusieurs autres antigènes.

35 Ces compositions multiépitopiques conformes à l'invention peuvent comprendre, pour être largement



utilisables sur une population dont les individus portent des allèles HLA différents, des épitopes présentés par différentes molécules du CMH I. Elles peuvent également comprendre en outre au moins un épitope présenté par une  
5 molécule du CMH II, et capable d'induire une réponse T auxiliaire.

Selon un mode de réalisation préféré d'une composition conforme à l'invention, elle comprend au moins un polypeptide chimérique comprenant une ou  
10 plusieurs copies d'un peptide immunogène conforme à l'invention. Dans le cas d'une composition multiépitopique, ledit polypeptide chimérique comprend en outre une ou plusieurs copies d'au moins un autre épitope immunogène.

15 Un tel polypeptide chimérique peut être facilement obtenu par des méthodes connues en elles-mêmes, et notamment par les techniques classiques de l'ADN recombinant.

La présente invention a également pour objet  
20 les molécules d'acide nucléique codant pour un peptide immunogène ou pour un polypeptide chimérique conforme à l'invention.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un épitope peptidique immunogène, d'une  
25 composition, ou d'une molécule d'acide nucléique conforme à l'invention pour l'obtention d'un médicament, et notamment d'un médicament destiné à l'immunothérapie antitumorale, et en particulier au traitement de tumeurs exprimant EphA2.

30 Ceci englobe une grande variété de tumeurs, parmi lesquelles on citera notamment les tumeurs du colon, du sein, de la prostate, du poumon, de l'estomac, du rein, et de l'œsophage.

Les peptides p58, p61, p546, p550, p883 et  
35 p61Y sont notamment utilisables pour l'obtention de

médicaments destinés au traitement de patients HLA-A\*0201.

La présente invention englobe également les médicaments comprenant, en tant que principe actif, au moins un peptide immunogène, une composition, ou une molécule d'acide nucléique conforme à l'invention.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, lesdits médicaments sont des vaccins.

Des médicaments conformes à l'invention peuvent comprendre en outre les excipients usuels, ainsi que des adjuvants habituellement utilisés en immunothérapie, et permettant par exemple de favoriser l'administration du principe actif, de le stabiliser, d'augmenter son immunogénicité, etc.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant l'induction d'une réponse cytotoxique antitumorale par des peptides conformes à l'invention issus de l'antigène EphA2.

**EXEMPLE 1 : IDENTIFICATION D'EPITOPES D'EPHA2 PRESENTES PAR LA MOLECULE HLA-A\*0201.**

La séquence d'acides aminés de la protéine EphA2 a été analysée à l'aide du logiciel BIMAS (PARKER et al., *J. Immunol.* 152, 163, 1994), afin d'identifier des peptides potentiellement capables de se lier à HLA-A\*0201. Parmi les épitopes potentiels identifiés, les cinq peptides suivants :

p58 : IMNDMPIYM (SEQ ID NO: 4);  
p61 : DMPIYMYSV (SEQ ID NO: 5);  
p546 : VLLLVLGV (SEQ ID NO: 6);  
p550 : VLAGVGFFI (SEQ ID NO: 7);  
p883 : TLADFDPV (SEQ ID NO: 8);  
ont été sélectionnés.

Les peptides correspondant à ces séquences ont été synthétisés par SYNT:EM (Nîmes, France). La pureté

(>85%) est contrôlée par chromatographie liquide à haut rendement en phase inverse. Les peptides sont lyophilisés, puis dissous dans du DMSO à 10 mg/mL et stockés à -80°C.

- 5 L'immunogénicité de ces peptides a été évaluée par la mesure de leur affinité pour HLA-A\*0201. Celle-ci est définie par deux paramètres : l'affinité relative (RA) qui reflète la capacité des peptides à se fixer à HLA-A\*0201, et la vitesse de dissociation des complexes HLA-A\*0201/peptide ( $DC_{50}$ ) qui témoigne de leur stabilité. Les peptides à affinité élevée ( $RA < 5$  et  $DC_{50} > 2$  hrs), sont potentiellement immunogènes, contrairement aux peptides à faible affinité ( $RA > 5$  et  $DC_{50} < 2$  hrs).

**Affinité relative :**

- 15 Des cellules T2 (FIRAT et al., Eur. J. Immunol., 29, 3112, 1999) ( $3 \times 10^5$  cellules/mL) humaines, qui sont déficientes en transporteurs TAP, sont incubées à 37°C pendant 16 heures avec diverses concentrations (100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M) de chaque peptide à tester dans du milieu RPMI 1640 sans sérum, supplémenté avec 100 ng/mL de  $\beta$ 2-microglobuline humaine. Ensuite, elles sont lavées deux fois, et marquées avec l'anticorps monoclonal BB7.2 (PARHAM et al., Hum. Immunol., 3, 4, 277-299, 1981) qui est spécifique de la molécule HLA-A\*0201, puis avec un anticorps de chèvre anti-Ig de souris, couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).

- Les cellules sont ensuite analysées en cytométrie de flux. Pour chaque concentration de peptide, la fluorescence spécifique de HLA-A\*0201 est calculée en tant que pourcentage de la fluorescence obtenue avec 100  $\mu$ M d'un peptide de référence (HIVpol 589 ; IVGAETFYV, SEQ ID NO: 2). L'affinité relative (RA) est définie comme le rapport de la concentration de chaque peptide induisant 20% de la fluorescence obtenue avec 100  $\mu$ M du peptide de référence, à la concentration du peptide de référence induisant 20% de la fluorescence obtenue avec

100  $\mu$ M dudit peptide de référence. Plus l'affinité relative est faible, et plus fortement le peptide se lie à HLA-A\*0201. La RA moyenne pour chaque peptide est déterminée à partir d'au moins trois expériences  
5 indépendantes. Dans toutes les expériences, 20% de la fluorescence maximale ont été obtenus pour 1 à 3  $\mu$ M du peptide de référence.

**Stabilité :**

Des cellules T2 ( $10^6$ /mL ) sont incubées  
10 pendant une nuit à 37°C avec 100  $\mu$ M de chaque peptide à tester dans du milieu RPMI 1640 sans sérum, supplémenté avec 100 ng/mL de  $\beta$ 2-microglobuline humaine. Ensuite, elles sont lavées à quatre reprises pour éliminer les peptides libres, incubées avec du BREFELDIN A (SIGMA ;  
15 10  $\mu$ g/mL ) pendant une heure pour prévenir l'expression à leur surface des molécules HLA-A\*0201 nouvellement synthétisées, lavées et incubées à 37°C pendant 0, 2, 4, 6 ou 8 heures en présence de BREFELDIN A (0,5  $\mu$ g/mL). Pour chaque temps d'incubation, les cellules sont ensuite  
20 marquées, comme indiqué ci-dessus, avec l'anticorps BB7.2, et analysées en cytométrie de flux pour évaluer la quantité de complexe peptide/HLA-A\*0201 présent à leur surface. Cette quantité est évaluée par la formule :  
(fluorescence moyenne des cellules T2 préincubées avec le  
25 peptide - fluorescence moyenne des cellules T2 traitées dans des conditions similaires en l'absence de peptide). Le  $DC_{50}$  (complexe de dissociation : DC) est défini comme étant le temps (en heures) requis pour la perte de 50% des complexes HLA-A\*0201/peptide stabilisés à t=0.

30 Les résultats de ces expérimentations sont présentés dans le Tableau I ci-après.

Tableau I

Peptide	Séquence	RA	DC <sub>50</sub>
p58	IMNDMPIYM	1	4
p61	DMPIYMYSV	>10	ND
p61Y	YMPIYMYSV	1,5	ND
p546	VLLVLGV	1,4	4-6
p550	VLGVGFFI	1	4-6
p883	TLADFDPRV	2,2	2-4

ND : non déterminé.

Ces résultats montrent que les peptides p58, p546, p550 et p883 possèdent une affinité de liaison importante (RA de 1 à 2,2). En revanche, le peptide p61 présente une faible affinité pour HLA-A\*0201 (RA > 10) et devrait donc ne pas être immunogène. Pour améliorer l'affinité de ce peptide pour HLA-A\*0201, les inventeurs ont substitué l'acide aspartique en position 1 par une résidu tyrosine. Le peptide variant p61Y obtenu présente une affinité de liaison importante (RA=1,5), bien supérieure à celle du peptide dont il est dérivé.

Les résultats montrent également que les peptides p58, p546, p550 et p883 forment des complexes stables avec les molécules HLA-A\*0201 (DC<sub>50</sub> > 2h pour chacun d'entre eux).

#### EXEMPLE 2 : IMMUNOGENICITE DES PEPTIDES P58, P61Y, P546, P550 ET P883 :

#### Induction de CTL spécifiques par vaccination avec les peptides

L'immunogénicité des peptides p58, p61Y, p546, p550 et p883 a été évaluée par génération de CTL sur des souris transgéniques HHD (PASCOLO et al., J. Exp. Med., 185, 2043, 1997). Ces souris sont  $\beta 2m^{-/-}, D^b^{-/-}$  et expriment une monochaine HLA-A\*0201 composée des domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  de HLA-A\*0201 et des domaines  $\alpha 3$  et intracellulaire de  $D^b$ , reliée par son extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale de la  $\beta 2$ -microglobuline humaine par un peptide de 15 acides aminés.

Les souris HHD reçoivent une injection sous-cutanée à la base de la queue avec 100 µg de chaque peptide à tester émulsifié dans de l'adjuvant incomplet de Freund, en présence de 140 µg d'un épitope auxiliaire  
5 T dérivé de l'antigène « core » de HBV (128-140, séquence TPPAYRPPNAPIL, SEQ ID NO: 10).

Après 11 jours, des cellules spléniques prélevées sur les souris ( $5 \times 10^7$  cellules dans 10 mL) sont stimulées *in vitro* avec le peptide à tester (10 µM). Au  
10 6ème jour de culture, les populations qui répondent sont testées pour déterminer une cytotoxicité spécifique. Les cellules qui répondent sont restimulées *in vitro* à des intervalles d'une semaine avec  $2 \times 10^7$  cellules spléniques HHD irradiées (3000 rads) et 1 à 0,1 µM de peptide en  
15 présence de 50 UI/mL d'IL2 recombinante (PROLEUKIN, CHIRON CORP).

Des essais de cytotoxicité sont effectués 6 jours après la dernière stimulation.

Des cellules RMA-S-HHD sont utilisées comme  
20 cibles pour étudier la cytotoxicité. Ces cellules sont obtenues par transfection de cellules RMA-S murines avec la construction HHD comme décrit par PASCOLO et al. (J. Exp. Med., 185, 2043, 1997).

Ces cellules-cibles sont marquées avec 100 µCi  
25 de  $^{51}\text{Cr}$  pendant 90 minutes, puis lavées trois fois et étalées dans des plaques de 96 puits à fond rond ( $3 \times 10^3$  cellules/puits dans 100 µl de RPMI 1640 + 3% de sérum de veau fœtal). Elles sont chargées avec 1 µM du peptide à tester, ou d'un peptide témoin non-pertinent, à 37°C  
30 pendant 90 minutes.

Ensuite, 100 µl des cellules effectrices (rapport cellules effectrices/cellules cible = 40/1) sont ajoutées dans les puits et les plaques sont incubées à 37°C pendant 4 heures. Après incubation, 100 µl de  
35 surnageant sont collectés et la radioactivité est mesurée dans un compteur γ.

Le pourcentage de lyse spécifique est calculé par la formule :  $[(\text{libération de } ^{51}\text{Cr expérimentale} - \text{libération de } ^{51}\text{Cr spontanée}) / (\text{libération de } ^{51}\text{Cr maximale} - \text{libération de } ^{51}\text{Cr spontanée})] \times 100$ . Dans toutes les expériences, la libération spontanée est inférieure à 20% de la libération maximale induite par HCl 3N.

Les résultats de ces expérimentations pour les peptides p58 et p550 sont illustrés par la Figure 2.

□ : peptide non-pertinent ;

10 ■ : peptide EphA2.

Ces résultats montrent que l'immunisation par le peptide p58 ou p550 génère des CTL qui tuent les cibles RMAS-HHD chargées avec ce même peptide, mais pas les cellules chargées avec le peptide non-pertinent. Des résultats équivalents ont été obtenus avec les peptides p61Y, p546 et p883.

Des lignées de CTL, respectivement dénommées mCTL58, mCTL61Y, mCTL546, mCTL550 et mCTL883 ont été établies, à partir des cellules spléniques de souris HDD immunisées avec le peptide p58, p61Y, p546, p550 ou p883, par stimulation répétées *in vitro* avec des concentrations décroissantes (10  $\mu\text{M}$ -1  $\mu\text{M}$ ) du même peptide.

L'avidité de ces lignées pour leur peptide inducteur a été déterminée en mesurant, comme décrit ci-dessus, leur cytotoxicité vis-à-vis de cellules cibles RMAS-HHD chargées avec des concentrations croissantes (1 pM à 10  $\mu\text{M}$ ) du peptide concerné.

Les résultats sont illustrés par la Figure 3.

Ces résultats montrent que les lignées mCTL58, mCTL61Y, mCTL546, mCTL550 et mCTL883 possèdent une avidité relativement élevée. On obtient 50% de la lyse maximale pour des concentrations de peptide qui vont de 3 nM dans le cas de mCTL546 à 40 nM dans le cas de mCTL61Y.

**EXEMPLE 3 : RECONNAISSANCE DES EPITOPES APPRETES  
NATURELLEMENT DE L'ANTIGENE EPHA2 PAR DES CTL INDUITES  
PAR LES PEPTIDES P58 OU P550**

Pour tester si les peptides p58 et p550  
5 constituent des épitopes apprêtés naturellement de  
l'antigène EphA2, la réponse des cellules des lignées  
mCTL58 et mCTL550 à des cellules exprimant cet antigène a  
été évaluée de deux manières différentes.

**1) Stimulation par des cellules COS-7 transfectées  
10 exprimant EphA2.**

Les cellules des lignées mCTL58 et mCTL550,  
sont stimulées avec des cellules COS-7 de singe co-  
transfectées avec la construction HHD (PASCOLO et al.  
précité) et un plasmide contenant l'ADNc de EphA2. A  
15 titre de témoins négatifs on utilise des cellules COS-7  
transfectées soit avec la construction HHD seule, soit  
avec le plasmide contenant l'ADNc de EphA2 seul.

La stimulation des CTL est évaluée par mesure  
de leur sécrétion de TNF- $\alpha$ . A titre de témoin positif, on  
20 utilise les cellules COS-7 transfectées avec la  
construction HHD et chargées avec le peptide p58 ou p550.

4 jours après la transfection, les cellules  
COS-7 sont mises en contact avec les cellules mCTL58 et  
mCTL550 à raison de  $5 \times 10^4$  CTL pour  $3 \times 10^4$  cellules COS-7  
25 dans du RPMI 1640 en présence de 10% SVF.

Après 6 heures d'incubation, le surnageant est  
prélevé (50  $\mu$ L), et mis en contact avec des cellules de  
fibrosarcome de souris WEHI164 clone 13 ( $3 \times 10^4$  par puits)  
qui se caractérisent par une forte sensibilité à  
30 l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$ . Afin de quantifier la  
teneur en TNF des surnageants de culture, une gamme  
étalon de TNF- $\alpha$  (concentrations de 0 à  $10^4$  pg/mL) est  
utilisée en parallèle. Après 16 heures d'incubation à  
37°C, la viabilité des cellules WEHI-164 clone 13 est  
35 déterminée par un test colorimétrique au MTT (SIGMA)



(ESPEVIK et NISSEN MEYER, J. Immunol. Methods., 95, 99, 1986).

Les résultats sont illustrés par la Figure 4.

- : cellules COS-7 non transfectées ;

5 EphA2 : cellules COS-7 transfectées par l'ADNc d'EphA2 seul ;

HHD : cellules COS-7 transfectées par la construction HHD seule ;

10 HHD + peptide : cellules COS-7 transfectées avec la construction HHD et chargées avec le peptide p58 ou p550 ;

HHD+ EphA2 : cellules COS-7 transfectées avec la construction HHD et l'ADNc d'EphA2.

15 Ces résultats montrent que les lignées mCTL58 et mCTL550 répondent à la stimulation par les cellules COS co-exprimant HHD et EphA2.

En revanche, on n'observe aucune réponse aux cellules COS transfectées séparément par la construction HHD ou par l'ADNc d'EphA2.

20 **2) Stimulation par des cellules tumorales humaines HLA-A\*0201 exprimant EphA2.**

Les lignées tumorales HLA-A\*0201 suivantes ont été utilisées : SAOS (sarcome), 1355 (cancer du poumon), Caco-2 (cancer du colon), HIEG (carcinome rénal), LNCaP  
25 (cancer de la prostate). La lignée DU145 (cancer de la prostate) n'exprimant pas HLA-A\*0201 a également été utilisée à titre de témoin négatif.

Parmi ces lignées, DU145 et Caco-2 sont connues comme exprimant EphA2, et LNCaP comme n'exprimant  
30 pas EphA2.

L'expression d'EphA2 dans les autres lignées tumorales a été évaluée par transfert de Western. Le niveau d'expression EphA2 dans l'ensemble des lignées utilisées est résumé dans le Tableau II ci-dessous.

Tableau II

Lignée cellulaire	Expression HLA-A*0201	Expression EphA2
SAOS	+	+
1355	+	+
Caco-2	+	+
HIEG	+	+
LNCaP	+	-
DU145	-	+

+ : forte expression

- : pas d'expression.

Les lignées mCTL58 et mCTL550 ont été  
 5 stimulées par les lignées tumorales SAOS, 1355, Caco-2,  
 HIEG, LNCaP, et DU145 mentionnées ci-dessus. Les lignées  
 mCTL61Y, mCTL546 et mCTL 883 ont été stimulées par les  
 lignées tumorales LNCaP, DU145 et Caco-2 mentionnées ci-  
 dessus. La stimulation est évaluée par détection de la  
 10 sécrétion de TNF- $\alpha$ , comme décrit ci-dessus.

Les résultats sont illustrés par les Figures  
 5A, 5B et 5C.

La figure 5A montre que les cellules mCTL58 et  
 mCTL550 répondent à la stimulation par les cellules Caco-  
 15 2, qui expriment HLA-A\*0201 et EphA2, mais ne répondent  
 ni aux cellules DU145 qui n'expriment pas HLA-A\*0201 ni  
 aux cellules LNCaP qui n'expriment pas EphA2.

La figure 5B montre que les cellules mCTL58 et  
 mCTL550 répondent à la stimulation par les cellules HIEG,  
 20 Caco-2, 1355 et SAOS qui expriment des quantités  
 importantes d'EphA2, mais ne répondent pas aux cellules  
 LNCaP qui n'expriment pas EphA2.

La figure 5C montre que les cellules mCTL61Y,  
 mCTL546 et mCTL883 répondent à la stimulation par les  
 25 cellules Caco-2 qui expriment des quantités importantes  
 d'EphA2, mais ne répondent pas aux cellules LNCaP et  
 DU145 qui n'expriment pas EphA2 et HLA-A\*0201  
 respectivement.

Les résultats des expérimentations ci-dessus  
 30 montrent que les CTL induits par p58, p61Y, p546, p550 ou

p883 reconnaissent des épitopes apprêtés naturellement de l'antigène EphA2.

**EXEMPLE 4 : INDUCTION DE CTL HUMAINS SPECIFIQUES DES PEPTIDES P58 OU P550.**

5                   La capacité de p58 et p550 à induire des CTL *in vitro* à partir de cellules mononucléées du sang périphérique (PMBC) de donneurs sains a été testée comme suit.

10                   Les PBMC sont obtenues, à partir de prélèvements sanguins par leucocytaphérèse sur des donneurs sains, après centrifugation à 2000 rpm pendant 20 min sur gradient de Ficoll/Hypaque (AMERSHAM). Après 3 lavages en NaCl 0,9%,  $10^7$  PBMC sont resuspendues dans  
15 3 mL de milieu complet (RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum humain AB inactivé par la chaleur), et incubées à 37°C pendant 2 heures. Après incubation, les cellules non-adhérentes sont prélevées et les cellules adhérentes sont différenciées en cellules dendritiques  
20 par ajout dans chacun des puits de 3 mL de milieu complet contenant 50 ng/mL de GM-CSF (R & D SYSTEMS) et 1000 UI/mL d'IL-4 (R & D SYSTEMS). Après 7 jours de culture les cellules dendritiques sont collectées et chargées avec le peptide p58 ou p550 par incubation  
25 pendant 4 heures à 20°C avec 40 µg/mL de peptide en présence de 3 µg/mL de β2-microglobuline, puis irradiées à 4200 rads ; elles sont ensuite lavées pour éliminer le peptide libre. Des cellules CD8+ sont isolées à partir des cellules non-adhérentes à l'aide de microbilles  
30 couplées à un anticorps anti-CD8 (MILTENYI BIOTEC).

0,5×10<sup>6</sup> cellules CD8+ sont stimulées par co-culture dans une plaque à 48 puits avec 2,5×10<sup>4</sup> cellules dendritiques chargées avec le peptide p58 ou p550, dans du milieu complet supplémenté avec 10ng/mL d'IL-7 dans un  
35 volume final de 500 µl/puits. Le jour suivant la mise en culture, on ajoute dans chacun des puits 10 ng/mL d'IL-10

humaine (R & D SYSTEMS) ; le deuxième jour, on ajoute dans chacun des puits 30 UI/mL d'IL-2 humaine. Le septième et le quatorzième jour après la première stimulation, les cellules CD8+ sont restimulées avec les  
5 cellules adhérentes chargées par 10 µg/mL de peptide en présence de 3 µg/mL de β2-microglobuline et irradiées. De l'IL-10 (10 ng/mL) et de l'IL-2 (30 UI/mL) sont ajoutées respectivement 24 heures et 48 heures après restimulation. Sept jours après la seconde restimulation,  
10 la réponse de ces cellules à des cellules T2 chargées avec p58 ou p550 ou avec un peptide non-pertinent, ou à des cellules tumorales HLA-A\*0201 Caco-2 (exprimant EphA2 et HLA-A\*0201), LNCaP (exprimant HLA-A\*0201 et n'exprimant pas EphA2), et DU145 (exprimant EphA2 et  
15 n'exprimant pas HLA-A\*0201) est évaluée par dosage de la production d'IFNγ intra-cellulaire.

Les cellules hCTL58 ou hCTL550 sont incubées avec les cellules T2 chargées, ou avec les cellules de la lignée tumorale testée, en présence de 20 µg/mL de  
20 BREFELDINE-A (SIGMA). Après 6 heures, elles sont lavées, marquées avec un anticorps anti-CD8 conjugué à la r-phycoérythrine (CALTAG LABORATORIES) dans du PBS pendant 25 min à 4°C, lavées et fixées avec du paraformaldéhyde à 4%. Elles sont ensuite perméabilisées par de la saponine  
25 (SIGMA) à 0,2% dans du PBS, et marquées avec un anticorps monoclonal anti-IFNγ conjugué à l'allophycocyanine (PHARMINGEN).

Les cellules sont ensuite analysées en cytométrie de flux (FACSCalibur™ (BECTON DICKINSON) et  
30 logiciel CellQuest™).

Les résultats (exprimés en nombre de cellules CD8+ productrices d'IFNγ pour 10<sup>5</sup> cellules CD8+) sont illustrés par les Figures 6A et 6B.

La Figure 6A montre que les CTLs humains  
35 obtenus à partir de cellules CD8+ stimulées respectivement par le peptide p58 (hCTL58) ou le peptide

p550 (hCTL550) sont activés par les cellules T2 chargées avec le peptide correspondant, et qu'on observe aucune activation par les cellules T2 chargées avec le peptide non-pertinent.

- 5           La Figure 6B montre une réponse des CTLs hCTL58 et hCTL550 vis-à-vis de la lignée tumorale Caco-2 (EphA2<sup>+</sup>, HLA-A\*0201<sup>+</sup>), mais pas vis-à-vis des lignées LNCaP (EphA2<sup>-</sup>, HLA-A\*0201<sup>+</sup>) et DU145 (EphA2<sup>+</sup>, HLA-A\*0201<sup>-</sup>).

- 10           Ces résultats démontrent que les peptides p58 ou p550 induisent des CTLs humains capables de reconnaître des cellules tumorales HLA-A\*0201<sup>+</sup> exprimant EphA2.

## REVENDICATIONS

1) Peptide immunogène constituant un épitope T présenté par le CMH I, caractérisé en ce qu'il est constitué par un fragment de 8 à 11 acides aminés consécutifs de l'antigène EphA2.

2) Peptide immunogène selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :

- le peptide de séquence IMNDMPIYM (SEQ ID NO:4);
- le peptide de séquence VLLLVLGV (SEQ ID NO:6);
- le peptide de séquence VLAGVGFFI (SEQ ID NO:7);
- le peptide de séquence TLADFDPVR (SEQ ID NO:8).

3) Peptide immunogène constituant un épitope T présenté par le CMH I, caractérisé en ce qu'il est dérivé d'un peptide constitué par un fragment de 8 à 11 acides aminés consécutifs de l'antigène EphA2, par substitution d'au moins un acide aminé dudit peptide, par un acide aminé augmentant l'affinité dudit peptide pour un allèle du CMH I.

4) Peptide immunogène selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est dérivé d'un peptide constitué par un fragment de 8 à 11 acides aminés consécutifs de l'antigène EphA2, par substitution de l'acide aminé N-terminal dudit peptide par un résidu tyrosine.

5) Peptide immunogène selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il est défini par la séquence YMPIYMSV (SEQ ID No : 9).

6) Polynucléotide codant pour un peptide selon une quelconque des revendications 1 à 5.

7) Composition comprenant au moins un peptide selon une quelconque des revendications 1 à 6, ou un polynucléotide selon la revendication 5.

8) Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une composition multiépitopique comprenant en outre un ou plusieurs autre(s) peptide(s) immunogène(s) ou un ou plusieurs polynucléotide(s) codant pour le(s)dit(s) peptide(s).

9) Composition selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polypeptide chimérique comprenant au moins une copie d'un peptide selon une

quelconque des revendications 1 à 5 et au moins une copie d'un autre peptide immunogène, ou d'un polynucléotide codant pour ledit polypeptide chimérique.

10) Utilisation d'un peptide selon une quelconque des revendications 1 à 5, d'un polynucléotide selon la revendication 6, ou d'une composition selon une quelconque des revendications 7 à 9, pour l'obtention d'un médicament.

11) Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à l'immunothérapie anti-tumorale.

12) Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à l'immunothérapie de tumeurs exprimant l'antigène EphA2.

13) Utilisation selon une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné au traitement de patients HLA-A\*0201.

hEphA2:

1 melqaaracf allwgcalaa aaaaqgkev lldfaaagge lgwlthpygk gwdlmqnmn  
61 dmpiymysvc nvmsgdgdw lrtnwvyrg aerifielkf tvrdcnsfpg gasscketfn  
121 lyaaesdldy gtnfqkrlft kidtiapdei tvssdfearh vklneersv gpltrkgfyl  
181 afqdigacva llsrvvykk cpellqqlah fpetiagsda pslatvagtc vdhavvppgg  
241 eeprmhcavd gewlvpiqqc lcqagyekve dacqacspgf fkfeasespc lecpehtlps  
301 pegatscece egffrapqdp asmpctrpps aphyltavgm gakvelrwtp pqdsggredi  
361 vysvtceqcw pesgecgpce asvrysepph gltrtsvtvs dlephmnytf tvearnvsg  
421 lvtsrsfrta svsingtepp kvrlegrstt slsvswsipp pqgsrvwkye vtyrkkgsdn  
481 synvrrtegf svtlldlapd ttylvqvqal tgegqgagsk vhefqtlspe gsgnlavigg  
541 vavgvlllv lagvgffihr rrknqrarqs pedvyfskse qlkplktyvd phtyedpnqa  
601 vlkftteihp scvtrqkvig agefgevykg mlktssgkke vpvaiktlka gytekqrddf  
661 lgeagimgqf shhniirleg viskykpmmi iteymengal dkflrekdge fsvlqlvgml  
721 rgiaagmkyl anmnyvhrdl aarnilvnsn lvckvsdfgl srvleddpea tyttsggkip  
781 irwtapeais yrkftsasdv wsfgivmwev mtygerpywe lsnhevmkai ndgfrlptpm  
841 dcpsaiyqlm mqcwqgerar rpkfadvsi ldklirapds lktladfdpr vsirlpstsg  
901 segvpfirtvs ewlesikmqy ytehfmaagy taiekvvqmt nddikrigvr lpghqkriay  
961 sllglkdqvn tvgipi

FIG 1



2/7

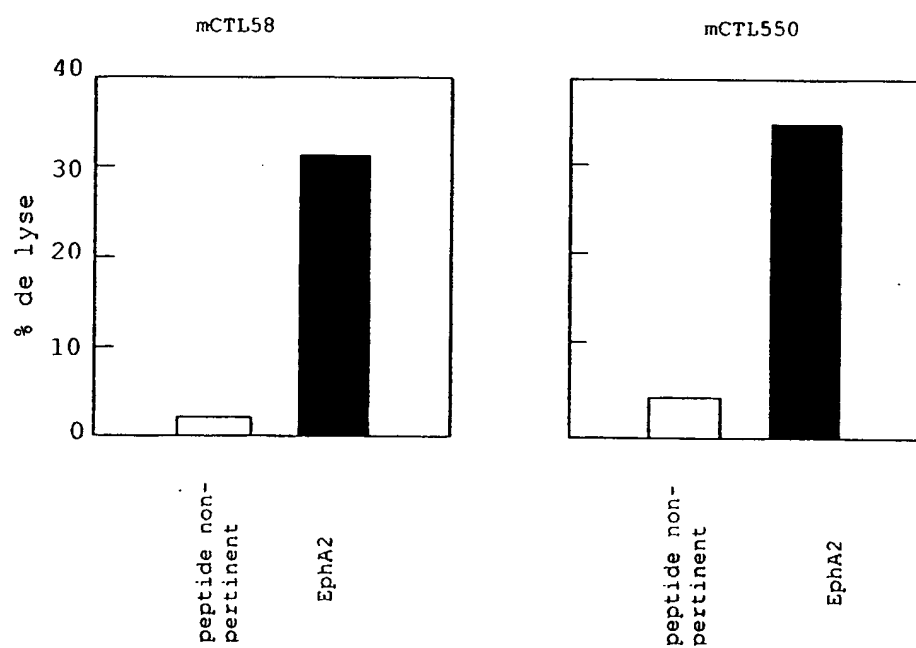


FIG 2

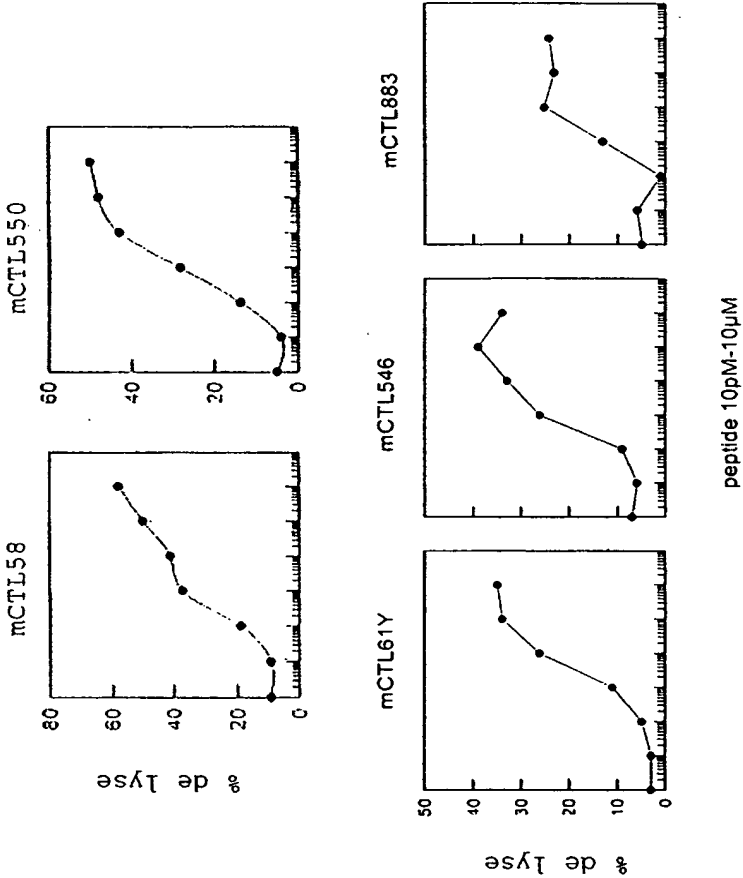


FIG 3

4/7

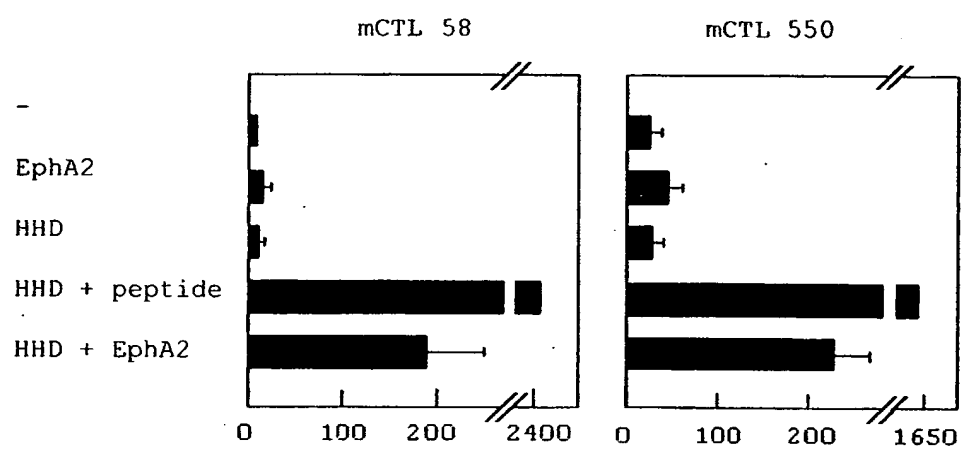


FIG 4

5/7

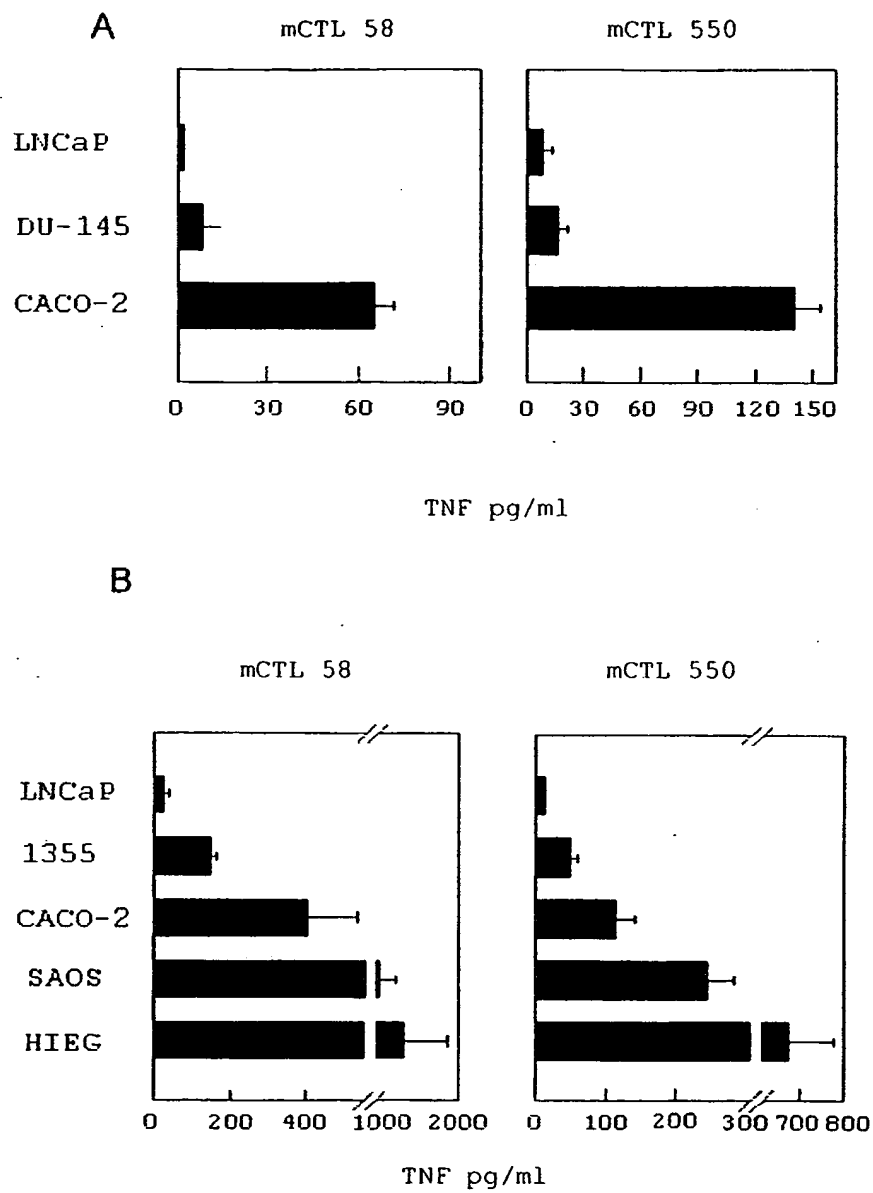


FIG 5

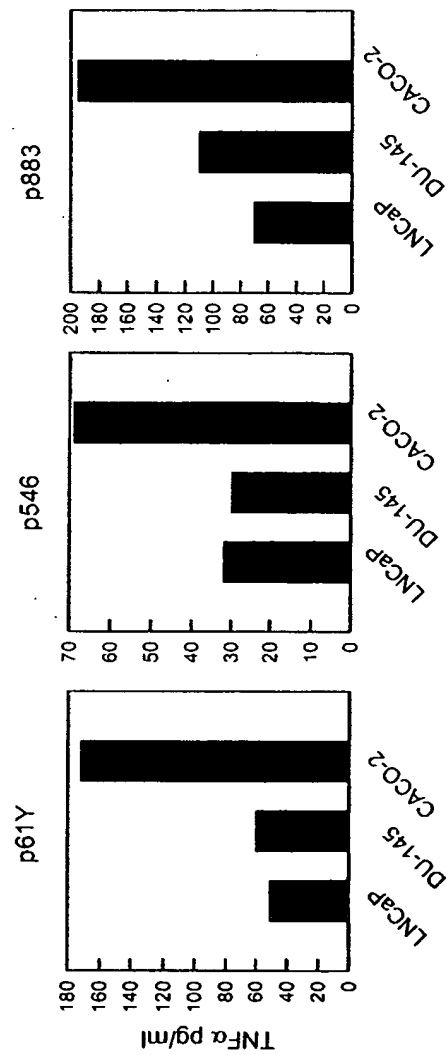


FIG 5

7/7

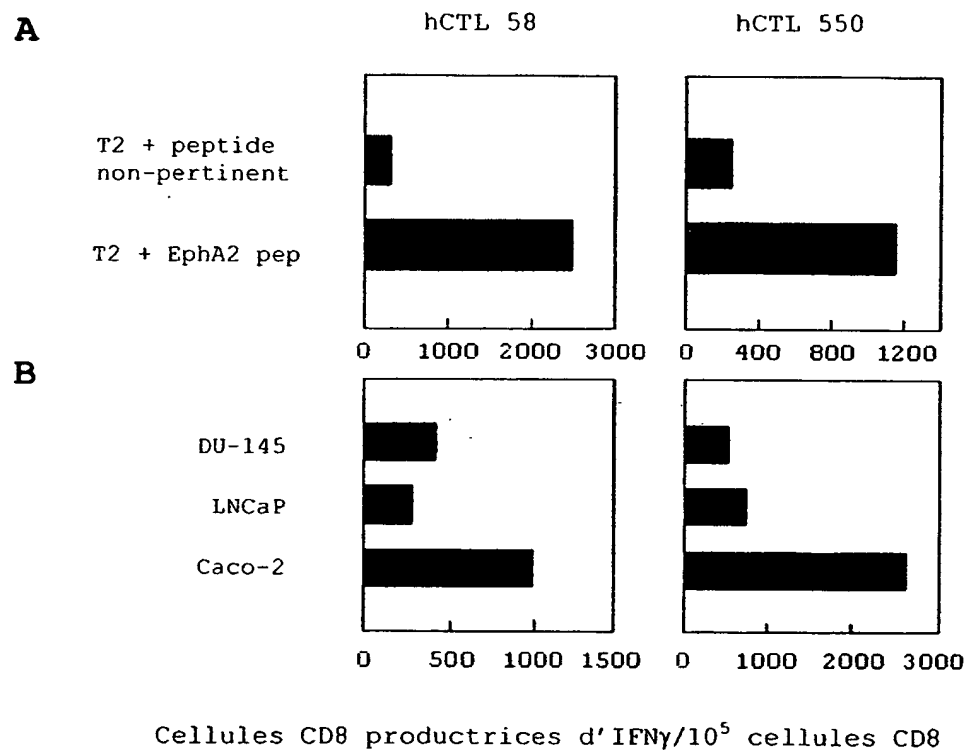


FIG 6

0598-069-EXT-SEQ.ST25  
SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; INSERM

IGR

KOSMATOPOULOS, Kostas

ALVES, Pédro

&lt;120&gt; EPITOPES T DE L'ANTIGENE EPHA2

&lt;130&gt; MJPah598/69EX

&lt;160&gt; 10

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 976

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Met Glu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Cys Phe Ala Leu Leu Trp Gly Cys  
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln Gly Lys Glu val val Leu Leu  
20 25 30

Asp Phe Ala Ala Ala Gly Gly Glu Leu Gly Trp Leu Thr His Pro Tyr  
35 40 45

Gly Lys Gly Trp Asp Leu Met Gln Asn Ile Met Asn Asp Met Pro Ile  
50 55 60

Tyr Met Tyr Ser Val Cys Asn Val Met Ser Gly Asp Gln Asp Asn Trp  
65 70 75 80

Leu Arg Thr Asn Trp Val Tyr Arg Gly Glu Ala Glu Arg Ile Phe Ile  
85 90 95

Glu Leu Lys Phe Thr Val Arg Asp Cys Asn Ser Phe Pro Gly Gly Ala  
100 105 110

0598-069-EXT-SEQ.ST25

Ser Ser Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Ala Glu Ser Asp Leu  
 115 120 125  
 Asp Tyr Gly Thr Asn Phe Gln Lys Arg Leu Phe Thr Lys Ile Asp Thr  
 130 135 140  
 Ile Ala Pro Asp Glu Ile Thr Val Ser Ser Asp Phe Glu Ala Arg His  
 145 150 155 160  
 Val Lys Leu Asn Val Glu Glu Arg Ser Val Gly Pro Leu Thr Arg Lys  
 165 170 175  
 Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Ile Gly Ala Cys Val Ala Leu Leu  
 180 185 190  
 Ser Val Arg Val Tyr Tyr Lys Lys Cys Pro Glu Leu Leu Gln Gly Leu  
 195 200 205  
 Ala His Phe Pro Glu Thr Ile Ala Gly Ser Asp Ala Pro Ser Leu Ala  
 210 215 220  
 Thr Val Ala Gly Thr Cys Val Asp His Ala Val Val Pro Pro Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Glu Glu Pro Arg Met His Cys Ala Val Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro  
 245 250 255  
 Ile Gly Gln Cys Leu Cys Gln Ala Gly Tyr Glu Lys Val Glu Asp Ala  
 260 265 270  
 Cys Gln Ala Cys Ser Pro Gly Phe Phe Lys Phe Glu Ala Ser Glu Ser  
 275 280 285  
 Pro Cys Leu Glu Cys Pro Glu His Thr Leu Pro Ser Pro Glu Gly Ala  
 290 295 300  
 Thr Ser Cys Glu Cys Glu Glu Gly Phe Phe Arg Ala Pro Gln Asp Pro  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro His Tyr Leu Thr  
 325 330 335  
 Ala Val Gly Met Gly Ala Lys Val Glu Leu Arg Trp Thr Pro Pro Gln  
 340 345 350  
 Asp Ser Gly Gly Arg Glu Asp Ile Val Tyr Ser Val Thr Cys Glu Gln  
 355 360 365  
 Cys Trp Pro Glu Ser Gly Glu Cys Gly Pro Cys Glu Ala Ser Val Arg  
 370 375 380



## 0598-069-EXT-SEQ.ST25

Tyr Ser Glu Pro Pro His Gly Leu Thr Arg Thr Ser Val Thr Val Ser  
 385 390 395 400  
 Asp Leu Glu Pro His Met Asn Tyr Thr Phe Thr Val Glu Ala Arg Asn  
 405 410 415  
 Gly Val Ser Gly Leu Val Thr Ser Arg Ser Phe Arg Thr Ala Ser Val  
 420 425 430  
 Ser Ile Asn Gln Thr Glu Pro Pro Lys Val Arg Leu Glu Gly Arg Ser  
 435 440 445  
 Thr Thr Ser Leu Ser Val Ser Trp Ser Ile Pro Pro Pro Gln Gln Ser  
 450 455 460  
 Arg Val Trp Lys Tyr Glu Val Thr Tyr Arg Lys Lys Gly Asp Ser Asn  
 465 470 475 480  
 Ser Tyr Asn Val Arg Arg Thr Glu Gly Phe Ser Val Thr Leu Asp Asp  
 485 490 495  
 Leu Ala Pro Asp Thr Thr Tyr Leu Val Gln Val Gln Ala Leu Thr Gln  
 500 505 510  
 Glu Gly Gln Gly Ala Gly Ser Lys Val His Glu Phe Gln Thr Leu Ser  
 515 520 525  
 Pro Glu Gly Ser Gly Asn Leu Ala Val Ile Gly Gly Val Ala Val Gly  
 530 535 540  
 Val Val Leu Leu Leu Val Leu Ala Gly Val Gly Phe Phe Ile His Arg  
 545 550 555 560  
 Arg Arg Lys Asn Gln Arg Ala Arg Gln Ser Pro Glu Asp Val Tyr Phe  
 565 570 575  
 Ser Lys Ser Glu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Thr Tyr Val Asp Pro His  
 580 585 590  
 Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Gln Ala Val Leu Lys Phe Thr Thr Glu Ile  
 595 600 605  
 His Pro Ser Cys Val Thr Arg Gln Lys Val Ile Gly Ala Gly Glu Phe  
 610 615 620  
 Gly Glu Val Tyr Lys Gly Met Leu Lys Thr Ser Ser Gly Lys Lys Glu  
 625 630 635 640  
 Val Pro Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Ala Gly Tyr Thr Glu Lys Gln  
 645 650 655

0598-069-EXT-SEQ.ST25

Arg Val Asp Phe Leu Gly Glu Ala Gly Ile Met Gly Gln Phe Ser His  
 660 665 670  
 His Asn Ile Ile Arg Leu Glu Gly Val Ile Ser Lys Tyr Lys Pro Met  
 675 680 685  
 Met Ile Ile Thr Glu Tyr Met Glu Asn Gly Ala Leu Asp Lys Phe Leu  
 690 695 700  
 Arg Glu Lys Asp Gly Glu Phe Ser Val Leu Gln Leu Val Gly Met Leu  
 705 710 715 720  
 Arg Gly Ile Ala Ala Gly Met Lys Tyr Leu Ala Asn Met Asn Tyr Val  
 725 730 735  
 His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Val Asn Ser Asn Leu Val  
 740 745 750  
 Cys Lys Val Ser Asp Phe Gly Leu Ser Arg Val Leu Glu Asp Asp Pro  
 755 760 765  
 Glu Ala Thr Tyr Thr Thr Ser Gly Gly Lys Ile Pro Ile Arg Trp Thr  
 770 775 780  
 Ala Pro Glu Ala Ile Ser Tyr Arg Lys Phe Thr Ser Ala Ser Asp Val  
 785 790 795 800  
 Trp Ser Phe-Gly Ile Val Met Trp Glu Val Met Thr Tyr Gly Glu Arg  
 805 810 815  
 Pro Tyr Trp Glu Leu Ser Asn His Glu Val Met Lys Ala Ile Asn Asp  
 820 825 830  
 Gly Phe Arg Leu Pro Thr Pro Met Asp Cys Pro Ser Ala Ile Tyr Gln  
 835 840 845  
 Leu Met Met Gln Cys Trp Gln Gln Glu Arg Ala Arg Arg Pro Lys Phe  
 850 855 860  
 Ala Asp Ile Val Ser Ile Leu Asp Lys Leu Ile Arg Ala Pro Asp Ser  
 865 870 875 880  
 Leu Lys Thr Leu Ala Asp Phe Asp Pro Arg Val Ser Ile Arg Leu Pro  
 885 890 895  
 Ser Thr Ser Gly Ser Glu Gly Val Pro Phe Arg Thr Val Ser Glu Trp  
 900 905 910  
 Leu Glu Ser Ile Lys Met Gln Gln Tyr Thr Glu His Phe Met Ala Ala  
 915 920 925

0598-069-EXT-SEQ.ST25

Gly Tyr Thr Ala Ile Glu Lys Val Val Gln Met Thr Asn Asp Asp Ile  
 930 935 940

Lys Arg Ile Gly Val Arg Leu Pro Gly His Gln Lys Arg Ile Ala Tyr  
 945 950 955 960

Ser Leu Leu Gly Leu Lys Asp Gln Val Asn Thr Val Gly Ile Pro Ile  
 965 970 975

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human immunodeficiency virus

&lt;400&gt; 2

Ile Val Gly Ala Glu Thr Phe Tyr Val  
 1 5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human herpesvirus 5

&lt;400&gt; 3

Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe Thr Val  
 1 5 10

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

Ile Met Asn Asp Met Pro Ile Tyr Met  
 1 5

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

0598-069-EXT-SEQ.ST25

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

Asp Met Pro Ile Tyr Met Tyr Ser val  
1 5

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

val Leu Leu Leu val Leu Ala Gly val  
1 5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

val Leu Ala Gly val Gly Phe Phe Ile  
1 5

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

Thr Leu Ala Asp Phe Asp Pro Arg val  
1 5

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

0598-069-EXT-SEQ.ST25

<220>

<223> peptide immunogène

<400> 9

Tyr Met Pro Ile Tyr Met Tyr Ser Val  
1 5

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 10

Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu  
1 5 10

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
6 novembre 2003 (06.11.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2003/091383 A3

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 9/12,  
A61K 38/04, 39/00, C12N 15/11, 15/62

(74) Mandataires : VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.;  
CABINET ORES, 36, rue de St Pétersbourg, F-75008  
PARIS (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/001280

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 23 avril 2003 (23.04.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
02/05048 23 avril 2002 (23.04.2002) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR),  
brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :  
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA  
RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de  
Tolbiac, F-75013 PARIS (FR). INSTITUT GUSTAVE  
ROUSSY [FR/FR]; 39, rue Camille Desmoulins, F-94800  
VILLEJUIF (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(72) Inventeurs; et

(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale: 1 avril 2004

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : KOS-  
MATOPOULOS, Kostas [GR/FR]; 70, rue du Javelot,  
F-75013 PARIS (FR). ALVES, Pedro [PT/FR]; 10, sentier  
des Voisinoux, F-92190 MEUDON (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

WO 2003/091383 A3

(54) Title: EPHA2 ANTIGEN T EPITOPES

(54) Titre : EPITOPES T DE L'ANTIGÈNE EPHA2.

(57) Abstract: The invention concerns peptides constituting T epitopes of EphA antigen, exhibited by MHC I. Said peptides are useful in particular in antitumoral immunotherapy.

(57) Abrégé : L'invention est relative à des peptides constituant des épitopes T de l'antigène EphA2, présentés par le CMH I. Ces peptides sont utilisables notamment en immunothérapie anti-tumorale.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/FR 03/01280

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N9/12 A61K38/04 A61K39/00 C12N15/11 C12N15/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, WPI Data, EPO-Internal, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; HIROAKI, HIDEKAZU ET AL: "Determination of the solution structure of the SH3 domain of human p56 Lc tyrosine kinase" retrieved from STN Database accession no. 126:16202 CA XP002234125 & JOURNAL OF BIOMOLECULAR NMR (1996), 8(2), 105-122, 1996, abstract	3-13
A	US 6 323 016 B1 (J YE ET AL.) 27 November 2001 (2001-11-27) the whole document	1, 3-13
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 October 2003

Date of mailing of the international search report

05/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat      lication No  
PCT/FR 03/01280

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2002/025570 A1 (J YE ET AL.) 28 February 2002 (2002-02-28) the whole document ---	1,3-13
A	R A LINDBERG & T HUNTER: "cDNA cloning and characterization of eck, an epithelial cell receptor protein-tyrosine kinase in the eph/elk family of protein kinases" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY., vol. 10, no. 12, December 1990 (1990-12), pages 6316-6324, XP000615509 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON., US ISSN: 0270-7306 cited in the application the whole document -----	1-13



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 03/01280

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6323016 B1	27-11-2001	US 2002025570 A1	28-02-2002
US 2002025570 A1	28-02-2002	US 6323016 B1	27-11-2001
		AU 1130502 A	24-06-2002
		WO 0248328 A2	20-06-2002

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Nationale No  
PCT/FR 03/01280

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 7 C12N9/12 A61K38/04 A61K39/00 C12N15/11 C12N15/62		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A61K C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) CHEM ABS Data, WPI Data, EPO-Internal, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie.*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DATABASE CA 'en ligne! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; HIROAKI, HIDEKAZU ET AL: "Determination of the solution structure of the SH3 domain of human p56 Lc tyrosine kinase" retrieved from STN Database accession no. 126:16202 CA XP002234125 & JOURNAL OF BIOMOLECULAR NMR (1996), 8(2), 105-122, 1996, abrégé	3-13
A	US 6 323 016 B1 (J YE ET AL.) 27 novembre 2001 (2001-11-27) le document en entier	1,3-13
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		
<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
<b>* Catégories spéciales de documents cités:</b> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  20 octobre 2003		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  05/11/2003
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Masturzo, P

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande

Requête No

PCT/FR 03/01280

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 2002/025570 A1 (J YE ET AL.) 28 février 2002 (2002-02-28) le document en entier -----	1, 3-13
A	R A LINDBERG & T HUNTER: "cDNA cloning and characterization of eck, an epithelial cell receptor protein-tyrosine kinase in the eph/elk family of protein kinases" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY., vol. 10, no. 12, décembre 1990 (1990-12), pages 6316-6324, XP000615509 AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON., US ISSN: 0270-7306 cité dans la demande le document en entier -----	1-13

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Deman  
rtionale No  
PCT/FR 03/01280

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6323016 B1	27-11-2001	US 2002025570 A1	28-02-2002
US 2002025570 A1	28-02-2002	US 6323016 B1	27-11-2001
		AU 1130502 A	24-06-2002
		WO 0248328 A2	20-06-2002

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**